

РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ЖКТ ЦЫПЛЯТ**Е.Ф. Чернявская, В.А. Прокулевич*, Н.А. Белясова***Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь;***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь**e-mail: chernyavskaya@belstu.by***Введение.**

Желудочно-кишечный тракт птиц с упрощенной пищеварительной системой, в частности кур, содержит особенно большое количество разнообразных видов микроорганизмов. Согласно недавним исследованиям, микробиота ЖКТ кур может включать более 650 видов, большая часть которых принадлежит к неизвестным бактериальным родам [1]. Исследования, проведенные со стерильными животными, убедительно доказали, что микробиота ЖКТ оказывает огромное влияние на развитие цыплят, улучшая не только общие физиологические функции кишечника, но также иммунные, пищевые и защитные способности организма [2, 3].

Считается, что наиболее благоприятным влиянием колонизирующих ЖКТ микроорганизмов на организм хозяина служит повышение его устойчивости к патогенной микробиоте, в основе чего лежит феномен конкурентного ингибирования. Выявлена устойчивая взаимосвязь между спектром нормальной кишечной микробиоты и способностью цыплят противостоять возбудителям энтеробактериозов. Показано, что у здоровых цыплят в течение первой недели жизни в зобе, двенадцатиперстной и подвздошной кишках преобладают энтерококки и лактобациллы, а в слепой кишке – энтерококки, лактобациллы и колиформные бактерии [4–6].

Биота пищеварительного тракта и иммунная система цыплят в значительной мере менее развиты, чем у взрослых птиц, которые защищены от кишечных инфекций благодаря сформировавшейся микробиоте и иммунитету, что накладывает особые обязательства на персонал птицефабрик по профилактике кишечных инфекций среди цыплят. Стабилизация микробиоты ЖКТ достигается только на 6–7 неделю после вылупливания, а полное становление микробиоценоза может занять более 30 недель.

В ходе молекулярных исследований доказано, что состав микробиоты ЖКТ цыплят и кур зависит от различий в питании, от состава пищевых добавок и пробиотиков [7]. Чтобы грамотно подобрать ингредиенты пищевых добавок и спектр микроорганизмов в составе пробиотиков, следует располагать сведениями о составе нормальной микробиоты цыплят, который, как известно, претерпевает существенные колебания в зависимости от возраста особей, от создаваемых в птичниках условий, от спектра профилактических и лечебных антимикробных препаратов и частоты обработки ими животных.

Целью данной работы являлась характеристика кишечной микробиоты цыплят разного возраста в условиях птицефабрик, где планируется внедрение разрабатываемых отечественных пробиотических препаратов.

Методы исследования.

Источниками микроорганизмов, колонизирующих ЖКТ цыплят, служили пробы помета цыплят в возрасте от 5 до 45 дней, отобранные в разных птичниках в апреле 2011 года (первая партия) и в период с декабря 2011 по январь 2012 года. Навески помета (по 10 мг) суспендировали в 1 мл физиологического раствора, по 50 мкл неразведенных и серийно разведенных суспензий засеивали глубинным методом, а также методом Коха в (на) разные среды в чашках Петри. Получение чистых культур проводили с использованием общепринятых методов [8]. Инкубирование и хранение бактерий осуществляли на плотных и в жидких средах М17 [9], в жидкой и на плотной среде LB [10] с использованием общепринятых методов [11].

Морфологию клеток оценивали посредством микроскопирования дифференциально окрашенных препаратов (окраска по Граму, окраска эндоспор) [12]. Тесты на каталазную, оксидазную активность и на способность к сквашиванию молока проводили с использованием общепринятых методов [8].

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реактивов PCR Master Mix (2x) и стандартных праймеров для гена 16S РНК в программируемом термоциклере «Терцик».

Секвенирование ДНК проводили с использованием набора BigDye Terminator 3.1. Для каждого образца ДНК осуществляли амплификацию с праймерами к гену 16S РНК, визуализировали ампликоны с помощью электрофореза, выделяли из геля и проводили секвенирующую реакцию. Электрофорез проводили в ДНК-анализаторе ABI PRISM 310 с соответствующим программным обеспечением. Результаты анализировали с использованием программного пакета Sequencing Analysis v5.3.0. Анализ результатов сиквенса проводили с помощью программ BLAST [13].

Результаты и обсуждение.

Для выделения из помета цыплят прокаринот наиболее широкого спектра видов, характеризующихся различными питательными потребностями, оптимумами температуры и значений рН, применяли метод получения микробного «пейзажа» [14] с использованием богатых питательных сред, удовлетворяющих потребностям широкого спектра бактерий, и инкубированием посевов при разной температуре. В частности, для выделения мезофильных гетеротрофных бактерий использовали среду LB и температуру 30°C, для выделения полиауксотрофных мезофильных молочнокислых бактерий (МКБ) использовали пептонно-дрожжевую среду M17 и температуру 30°C, для выделения термофильных прокаринот применяли те же среды и температуру 42°C (температура организмов цыплят).

Из проб помета первой партии, отобранных в 2011 году, в виде чистых культур выделено 142 штамма доминирующих бактерий, чье количественное представительство в составе проб помета превышало 10³ КОЕ/г (таблица 1). Чтобы исключить из числа изолятов, отобранных из помета разновозрастных цыплят, идентичные штаммы, анализировали не только морфологические свойства колоний и клеток, но также спектр чувствительности к широко распространенным антибиотикам (12 препаратов). В итоге для дальнейшего исследования осталось 72 изолята.

Таблица 1 – Концентрация клеток и количество штаммов, выделенных из помета цыплят (первая партия)

Условия выделения	Концентрация клеток, КОЕ/г					Количество штаммов				
	5 сутки	15 сутки	25 сутки	35 сутки	45 сутки	5 сутки	15 сутки	25 сутки	35 сутки	45 сутки
LB, 30 °C	3,1*10 ⁵	5,6*10 ⁵	2,4*10 ⁵	4,1*10 ⁵	6,7*10 ⁵	6	8	6	6	8
M 17, 30 °C	7,4*10 ⁶	2,3*10 ⁶	6,9*10 ⁵	5,6*10 ⁶	6,1*10 ⁶	24	10	10	12	14
M 17, 42 °C	8,5*10 ⁵	4,9*10 ⁵	3,2*10 ⁵	6,8*10 ⁵	5,1*10 ⁵	8	8	6	10	6
Итого:						38	26	22	28	28

Для предварительной идентификации выделенных бактерий использовали данные микроскопии дифференциально окрашенных препаратов, результаты тестов на каталазную и оксидазную активность, способность к сквашиванию молока, а также результаты секвенирования фрагментов генов 16S-РНК и ПЦР-амплификации с использованием специфичных к ДНК определенных видов м/о праймеров. Установлено, что доминирующие в ЖКТ цыплят бактерии представлены, в основном, грамположительными (64%) бактериями. Среди отобранных бактерий способные к дыханию (каталазоположительные) составляют 73%. Облигатно-аэробные бактерии, обладающие оксидазной активностью, составляют всего

9% от числа выделенных штаммов. Формирующих малиново-красные колонии на среде Эндо с лактозой и фиолетовые колонии на среде Левина энтеробактерий оказалось 36% [15], а способных к сквашиванию молока молочнокислых бактерий – 31%.

Среди 18 выделенных при 30 °С на среде М17 штаммов молочнокислых бактерий оказалось 15 изолятов (83%), которые проявили способность к росту при 42°С – температуре организма цыплят. Это служит косвенным указанием на то, что данные изоляты представлены аборигенными для ЖКТ цыплят видами.

На диаграмме (рисунок 1) представлены результаты анализа содержания в пробах помета цыплят разного возраста доминирующих бактерий разных групп.

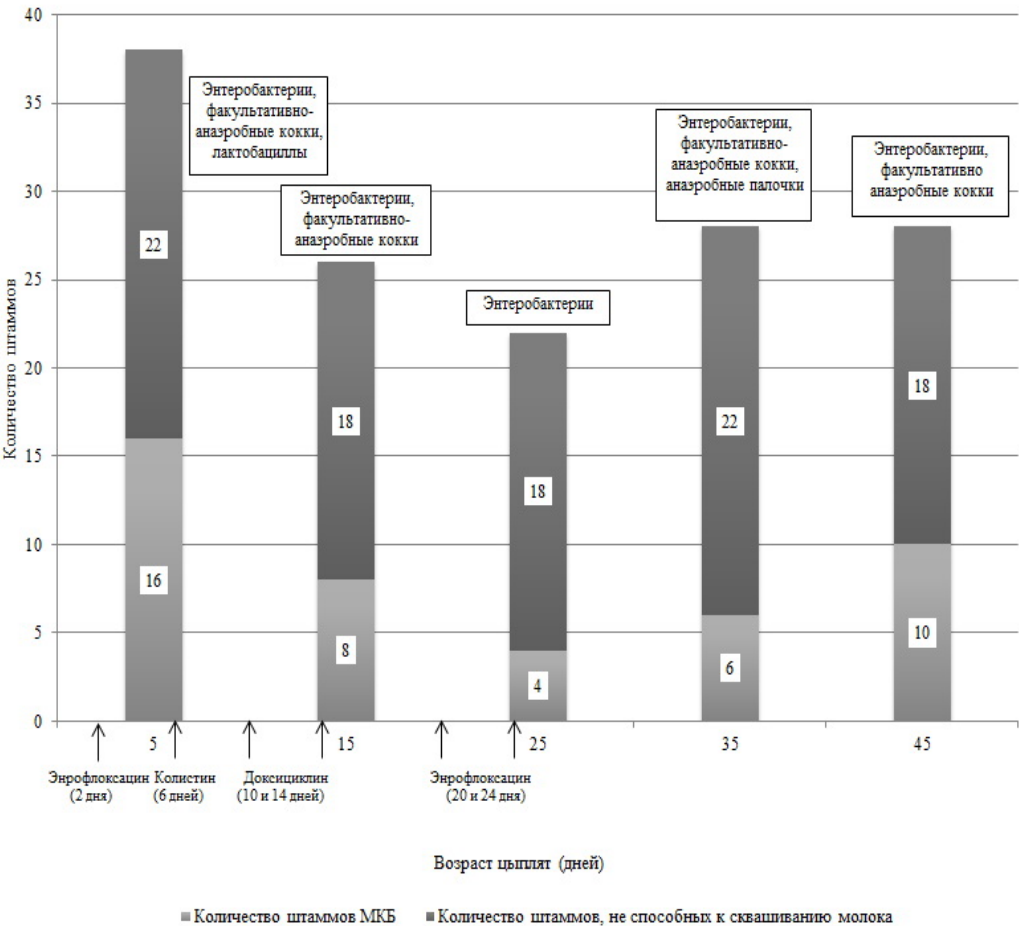


Рисунок 1 – Разнообразие доминирующих прокариот в помете цыплят разного возраста (партия 1): стрелками указан возраст цыплят, в котором их обрабатывают антибиотиками; в рамках над столбиками перечислены только преобладающие группы бактерий

Можно видеть, что преобладающими группами прокариот в ЖКТ цыплят всех исследованных возрастов являются энтеробактерии и факультативно-анаэробные кокки. Прослеживается динамика изменения разнообразия прокариот, колонизирующих ЖКТ цыплят: к 25-му дню жизни оно постепенно уменьшается, а затем снова возрастает. Подобный характер изменения разнообразия культивируемых бактерий из ЖКТ цыплят касается в первую очередь молочнокислых бактерий.

Наблюдаемые изменения в разнообразии прокариот, выделенных от особей разного возраста, можно связать с периодичностью обработки поголовья цыплят антибиотиками. Как видно из диаграммы на рис. 1, разнообразие МКБ, выделяемых из помета цыплят, резко снижается в период активной обработки поголовья птицы антибиотиками, что свидетельствует о высокой чувствительности различных видов МКБ к применяемым антибиотикам. По достижении цыплятами 25-дневного возраста обработка антибиотиками

прекращается, что способствует расширению микробного разнообразия. Характерно, что среди молочнокислых бактерий на 35-е сутки жизни цыплят в их ЖКТ на первое место выходят молочнокислые энтерококки, что может являться свидетельством их наилучшей приспособленности к выживанию в сложившихся условиях и высокой конкурентоспособности.

Неслучайных характер изменения разнообразия прокариот в ЖКТ цыплят подтвержден в исследовании помета цыплят второй партии (2012 г.), который отбирали из одного птичника с интервалами в 7 дней. В данном эксперименте выделено 284 доминирующих штамма бактерий, распределение количества которых по возрасту цыплят отображено в таблице 2 и на рис.2. Программа обработки цыплят антибиотиками совпадает с таковой для эксперимента, результаты которого отражены на рис. 1. Для исключения из числа изолятов идентичных штаммов, применяли те же подходы, что и для изолятов из помета 1-й партии. Это позволило сократить число выделенных штаммов доминирующих бактерий до 134.

Таблица 2 – Концентрация клеток и количество штаммов, выделенных из помета цыплят (вторая партия)

Условия выделения	Концентрация клеток, КОЕ/г						Количество штаммов					
	7 сутки	14сутки	21 сутки	28 сутки	35 сутки	42 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки	35 сутки	42 сутки
LB, 30 °С	6,1*10 ⁵	6,9*10 ⁵	4,3*10 ⁵	3,9*10 ⁵	4,1*10 ⁵	8,6*10 ⁵	12	15	10	8	8	11
М 17, 30 °С	8,3*10 ⁶	8,6*10 ⁶	4,8*10 ⁶	5,9*10 ⁶	4,7*10 ⁶	9,1*10 ⁶	24	26	18	26	21	25
М 17, 42 °С	7,8*10 ⁵	5,8*10 ⁵	3,7*10 ⁵	5,2*10 ⁵	6,4*10 ⁵	8,9*10 ⁵	14	13	10	12	11	18
Итого:							50	54	38	46	40	54

Общее число штаммов выделенных доминирующих бактерий в данном эксперименте значительно превышает таковое по отношению к пробам помета первой партии (табл.1), что возможно, объясняется изменением экологической обстановки на предприятии.

Анализ полученных данных показал, что доминирующие в ЖКТ цыплят бактерии представлены, в основном, грамположительными (78%) бактериями. Среди отобранных бактерий, способные к дыханию составляют 76%; облигатно-аэробные бактерии – 14%. Использование дифференциально-диагностических сред Эндо и Левина с лактозой позволило выявить 34% энтеробактерий, а тест на сквашивание молока – 37% молочнокислых бактерий.

Среди 38 выделенных при 30°С на среде М17 штаммов молочнокислых бактерий оказалось 32 (84%), способных к росту при 42 °С.

На основании результатов амплификации фрагментов ДНК молочнокислых бактерий с праймерами, специфичными к гену протеазы *htrA* [16] *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, 17 изолятов отнесены к данным видам; 2 из них являются представителями вида *E. faecalis* на основании результатов секвенирования фрагментов генов 16S-РНК.

Приведенные на рисунке 2 данные свидетельствуют о том, что число доминирующих штаммов молочнокислых бактерий в составе кишечной микробиоты цыплят одного птичника также подвержено колебаниям, которые можно соотнести с обработками животных антибиотиками: вначале, в период интенсивного скормливания антибиотиков, разнообразие молочнокислых бактерий уменьшается, а затем, после завершения программы обработки антибиотиками, постепенно увеличивается. Так же как в эксперименте с образцами помета партии 1 (рисунок 2), наблюдается преобладание энтерококков и энтеробактерий в составе микробиоты ЖКТ цыплят практически всех исследованных возрастов.

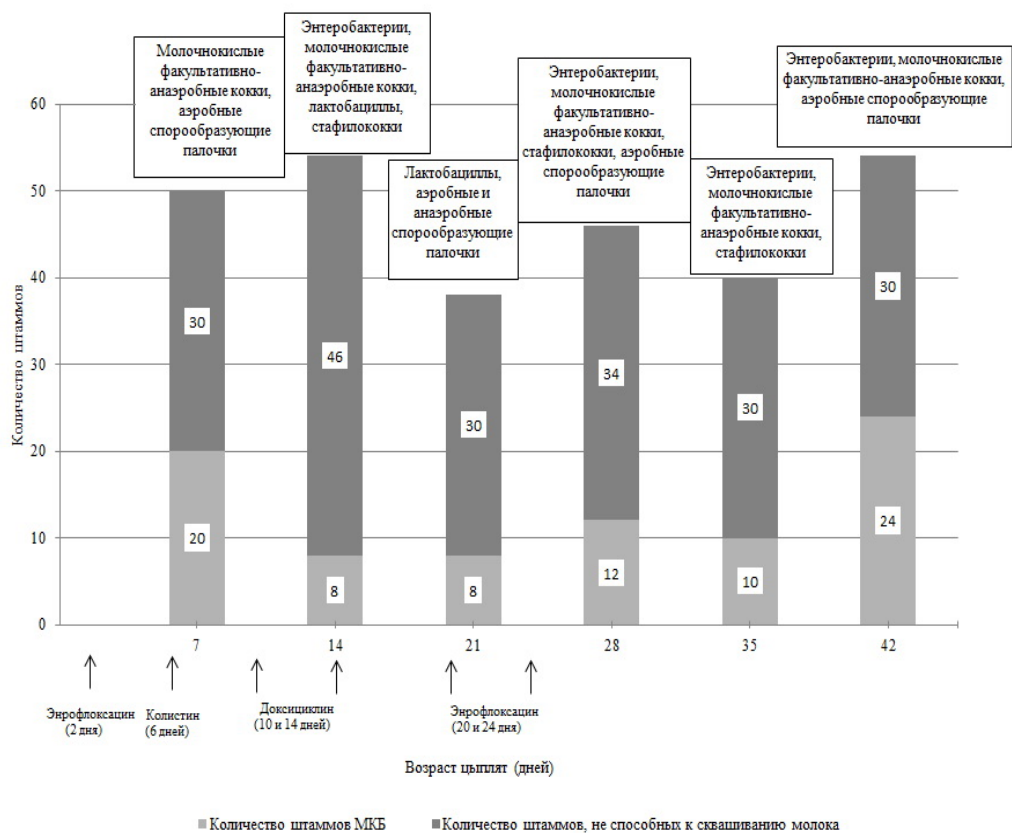


Рисунок 2 – Разнообразие доминирующих прокариот в помете цыплят разного возраста (партия 2): стрелками указан возраст цыплят, в котором их обрабатывают антибиотиками; в рамках над столбиками перечислены только преобладающие группы бактерий

На рисунке 3 представлено относительное содержание бактерий различных групп в ЖКТ 42-дневных цыплят. Можно видеть, что к шестой неделе жизни цыплят (через 3 недели после завершения программы обработки их антибиотиками) количество штаммов молочнокислых бактерий достигает почти половины от общего числа изолятов. Это является отражением благоприятного физиолого-биохимического статуса ЖКТ цыплят и их здоровья в целом, поскольку, как следует из данных литературы [17], количество и разнообразие молочнокислых бактерий в кишечном тракте животных обеспечивает конкурентное ингибирование развития патогенных микроорганизмов.

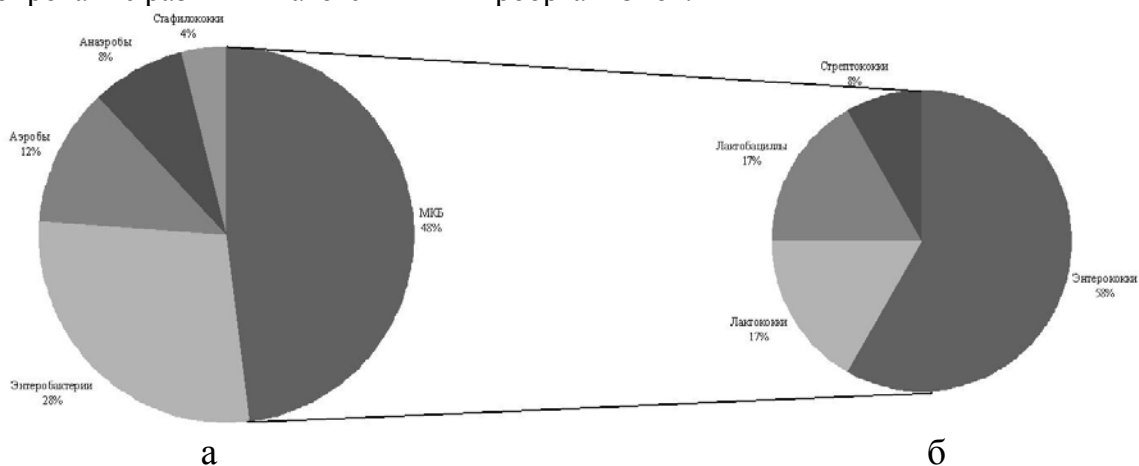


Рисунок 3 – Относительное содержание бактерий разных групп в ЖКТ 42-дневных цыплят: а – представители всех групп; б – представители молочнокислых бактерий

Как следует из диаграммы на рисунке 3б, среди молочнокислых бактерий преобладающими в ЖКТ к 42-му дню жизни цыплят становятся представители рода *Enterococcus*. В настоящее время многие исследователи выбирают именно бактерии рода *Enterococcus* для создания пробиотических препаратов [18]. Это обусловлено не только способностью данных бактерий успешно колонизировать ЖКТ хозяина, но также синтезом бактериоцинов и молочной кислоты, обеспечивающих антагонистические свойства энтерококков по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре [19]. Кроме того, некоторые исследования вскрывают эффективность энтерококков в стимуляции гуморального иммунитета у животных [20].

Выводы

Таким образом, в данной работе охарактеризовано разнообразие прокариот, доминирующих в ЖКТ цыплят разного возраста, показана роль молочнокислых бактерий и энтерококков, в частности, в восстановлении микробного статуса ЖКТ после воздействия антибиотиков разных групп. Данная информация обуславливает выбор энтерококков в качестве основы нового пробиотического препарата для птицы.

Список литературы

1. Apajalahti, J., Kettunen A., Graham. H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken // World's Poult. Sci. J. – 2004. – Vol. 60. – P. 223–232.
2. Netherwood T, Gilbert H.J., Parker D.S., O'Donnell A.G. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract // Appl Environ Microb. – 1999. – Vol. 65. – P. 5134–5138.
3. Patterson J.A., Burkholder K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production // Poultry Sci. – 2003. – Vol. 82. – P. 627–631
4. Lee K., Hyun S., Siragusa G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens // Journal Poultry Science. – 2010. – Vol. 47(2). – P. 106–114.
5. Callaway T.R., Edrington T.S., Anderson R.S., Harvey R.B., Genovese K.J., Kennedy C.N., Venn D.W. and Nisbet D.J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease // Animal Health Research Reviews. – 2008. – Vol. 9. – P. 217–225.
6. Donoghue A.M., Farnell M.B., Cole K. and Donoghue D.J. Mechanisms of pathogen control in the avian gastrointestinal tract // Avian Gut Functions in health and disease. – 2006. – Vol 28. – P. 138–155
7. Knarreborg, A., Simon M. A., Engberg R. M., Jensen B. B., and Tannock G. W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – 68. – P. 5918–5924
8. Методы общей бактериологии: в 3-х томах / под редакцией Ф. Герхардта [и др.]. – Москва, «Мир», 1983. – Т. 1. – 536 с.
9. Terzaghi, B.E. Sandine W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages // Appl Microbiol. – 1975. – № 29. – P. 807–813.
10. Miller, J. H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. – 1972. – 376 p.
11. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
12. Белясова Н.А. Микробиология. Лабораторный практикум. – Мн: 2007. – 160 с.
13. Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс] / BLAST. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. – Дата доступа: 16.08.2012.
14. Battin T.J., Sloan W.T., Kjelleberg S., Daims H., Head I.M., Curtis T.P., Eber L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research // Nature reviews microbiology. – 2007. – Vol. 5. – P. 76–81.

15. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: Справочник // Под редакцией В.А. Галынкина и В.И. Кочеровца. – СПб.: Проспект науки, 2006. – 336 с.

16. Чернявская Е.Ф. Пробиотический потенциал молочнокислых бактерий, выделенных из ЖКТ цыплят / Е.Ф. Чернявская, А.Д. Баешко, Н.А. Белясова / Молодежь в науке – 2013: приложение к журналу "Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі" Ч. 4: Серия биологических наук / Национальная академия наук Беларуси. – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 176–181

17. Калоев, Б.С. Научное обоснование и практическое использование молочнокислых препаратов в кормлении молодняка сельскохозяйственных животных и птицы: автореф. дис. ... д. с/х наук: 06.02.02 / Б.С. Калоев. – Владикавказ, 2003 – 36 с.

18. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health // International Journal of Food Microbiology. – 2006. – Vol. 106. – P. 1–24

19. Ennahar, S., Deschamps, N. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. // Journal of Applied Microbiology. – 2000. – Vol. 88. – P. 449–457.

20. Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. // Journal of Nutrition. – 2003. – Vol. 133. – P. 1158–1162.